

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



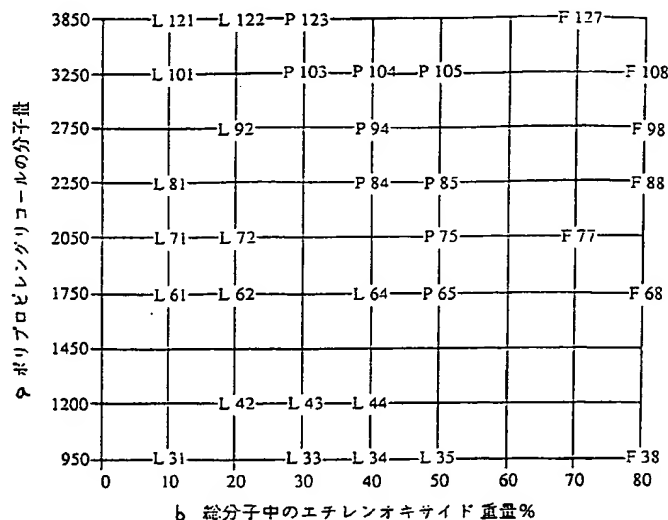
(51) 国際特許分類6 A61K 38/18, 47/32, A61F 2/28, A61B 17/56, A61M 37/00		A1	(11) 国際公開番号 WO97/18829
			(43) 国際公開日 1997年5月29日(29.05.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03333		(81) 指定国 AU, CA, CN, HU, KR, MX, NO, NZ, RU, UA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE).	
(22) 国際出願日 1996年11月14日(14.11.96)			
(30) 優先権データ 特願平7/322402 1995年11月17日(17.11.95) JP		添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヘキスト薬品工業株式会社 (HOECHST PHARMACEUTICALS & CHEMICALS K.K.)[JP/JP] 〒107 東京都港区赤坂2丁目17番51号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 志村武貞(SHIMURA, Takesada)[JP/JP] 鳥山五月(TORIYAMA, Satsuki)[JP/JP] 〒350-11 埼玉県川越市南台1丁目3番地2 日本ヘキスト・マリオン・ルセル株式会社 開発研究所内 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.) 〒102 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル Tokyo, (JP)			

(54) Title: CARTILAGE/BONE INDUCING MATERIALS FOR REPARATION

(54) 発明の名称 軟骨・骨誘導性修復用材料

(57) Abstract

Cartilage/bone inducing materials for reparation which contain a bone inducer and polyoxyethylene polyoxypropylene glycol. In a particularly preferable example, the molecular weight of the polypropylene glycol constituting the polyoxyethylene polyoxypropylene glycol falls within the range of from about 1,500 to 4,000, the weight ratio of the ethylene oxide units falls within the range of from about 40 to 80 %/molecule, and the concentration of the polyoxyethylene polyoxypropylene glycol is about 10 to 50 % based on the aqueous solution. These materials are used in the cartilage/bone induction method without requiring any operation. Because of being composed of a bone inducer and a carrier which is easily absorbed *in vivo*, highly compatible with the bone inducer and undergoes reversible sol-gel change depending on the temperature, they can be highly applicable to fracture and bone-defective sites and thus exert excellent therapeutic effects.



(57) 要約

骨誘導因子とポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を含む軟骨・骨誘導性修復用材料。特に、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成成分であるポリプロピレングリコールの分子量が約1500から4000およびエチレンオキサイドの重量比が約40～80%／分子の範囲にあり、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の対水溶液濃度が約10～50%であるものが好ましい。

外科的手術を必要としない軟骨・骨誘導方法において使用され、骨誘導因子と、生体吸収性が高く骨誘導因子との親和性が良く温度によってゾルーゲル可逆変化を起こす担体とからなるため、骨折・骨欠損部位への適用が容易であり、優れた治療効果を有する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BF	ブルキナファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボワール	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	US	米国
CZ	チェコ共和国	KR	韓国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
		LK	スリランカ	RO	ルーマニア		

明 細 書

軟 骨 ・ 骨 誘 導 性 修 復 用 材 料

技 術 分 野

5 本発明は骨折あるいは骨欠損の治療に有用な軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。さらに詳しくは、本発明は骨誘導因子とポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を含む軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。

背 景 技 術

10 軟骨・骨の修復方法として、患者自身の自家骨移植以外に骨誘導因子と適当な担体との組み合わせによる軟骨・骨欠損部の補てつ剤を患部に埋め込む方法が行われている。この場合、外科的手術時に患部を露出し骨誘導因子を含む軟骨・骨修復用材料を直接患部に適用する事が可能であるため、取り扱い易いブロック、スポンジおよびシート等の固体形態が広く用いられてきた。また、ゲルあるいはペースト等の半固体形態も
15 使用できる。これらの固体または半固体形態を可能にする担体としては、例えばステンレスおよびチタン合金等の金属やコラーゲンおよびハイドロキシアパタイト（HAP）またはそれらの混合剤等が利用されている。

一方、外科的手術を必要としない骨折や変形関節症などの治療に骨誘導因子を投与する試みがなされている。この投与形態は、非侵襲性投与
20 すなわち注入形態が患者の苦痛を軽減する点で切望されている。しかしながら骨誘導因子の単なる水性液剤をこの形態で投与すると、投与後の薬物の拡散消失が起こるため骨誘導因子を効率よく投与するためには適応患部へ一定期間骨誘導因子を滞留させる必要がある。そこで、投与時には通針性を有する液状であって投与後にゲル状に相変化し患部に骨誘導因子を滞留させ得る担体が考えられている。この担体としては毒性が
25 無く、生体との適合性が良く、生体吸収性が高いものが好ましい。

これまでに、骨誘導因子の担体としてはコラーゲンが知られており、

良好な生体適合性及び生体吸収性が認められている（特公平５－７５４２５号）。さらに注射可能なコラーゲンとの組み合わせについても知られており、注入可能な軟骨・骨形成材の可能性を有している（特公平７－２３３２２号及び特公平５－５３１４０号）。しかしながら、現在医薬品として

5 利用可能なコラーゲンはその起源がウシあるいはブタなどの天然物由来の材料であるために、その分子量、アミノ酸組成量、保水量等が一定しない。さらに、これらはヒトにとって異種の蛋白質であることに起因する抗原性等の副作用を有する。特に抗原性については、コラーゲンのテロペプチド部位を排除したアテロコラーゲンを使用しても完全に無くす

10 ことは出来ない（J. American Academy of Dermatology 10, 638-646 and 647-651, 1984及びJ. American Academy of Dermatology 21, 1203-1208, 1989）。

一方、ポリ乳酸やポリ乳酸グリコール酸共重合体等の生体分解性ポリマーを医薬用担体として用いることは知られている（US 5385887号及び

15 特公平６－２２５７０号）。しかし、これら生体分解性ポリマーの形状は固体形態または半固体形態であり、一定形態を保持する点で外科的手術時に適用する材料群に属する。仮に、この様な生分解性ポリマーを用いて注射可能な複合体を作製できたとしても、その製造工程において有機溶剤を使用せざるをえず、有効成分である骨誘導因子の失活が問題となるこ

20 とが容易に予測される。

発明の開示

本発明の目的は上に示したように従来法の不利点ないしは欠点を克服し、生体吸収性が高く、有効成分である骨誘導因子との親和性が良く、温度によってゾルーゲル可逆変化を起こすことにより骨誘導因子の薬効

25 を持続させ、さらには抗原性等の副作用の少ない軟骨・骨誘導性修復用材料を提供することにある。

本発明者らは外科的手術を必要としない骨修復方法において、有効成

分となる骨誘導因子とその担体との関係について鋭意検討していたところ、ある種のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類に、生体吸収性が高く骨誘導因子との親和性が良く温度によってゾルーゲル可逆変化を起こすものがあることを見い出した。本発明者らは、ポリオ

5 キシエチレンポリオキシプロピレングリコール類水性溶液に骨誘導因子を混合し、投与時1℃から30℃においては注入可能な液体であり投与後3分以内に37℃付近でゲル化する骨形成材を作製し、マウス大腿部筋肉内に投与後投与部位に骨誘導因子を保持させ、そこで異所性軟骨・骨形成能があることを見い出し、本発明を完成した。

10 本発明は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子とを含む軟骨・骨誘導性修復用材料に関するものである。

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類とは、親水性の低いポリプロピレングリコールを疎水基としエチレンオキサイドを親水基として付加した高分子型の非イオン性界面活性剤の総称であり、ポリ

15 プロピレングリコールの分子量及びエチレンオキサイドとの混合比を変化させることにより種々の特性を有する界面活性剤を構成することが可能となる。合成可能なポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の組成は、ポリプロピレングリコールの分子量が900から4000の範囲にあり、総分子中のエチレンオキサイドの重量%が5%から90%

20 である。例えば、旭電化社製のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類（アデカ®）は、ポリプロピレングリコールの分子量と付加するエチレンオキサイドの重量比により系統的に命名されており、その分類図を図1に示す。

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の産業上の利用としては、一般洗淨剤・消泡剤としての使用の他、医薬品の分野において軟下剤、軟膏基材、人工血液、錠剤の被膜、賦形剤、注射剤の可溶

25 化剤および溶解促進剤などに使用されている。特にプルロニックF-68

(ポリプロピレングリコールの分子量1750、エチレンオキサイド含量が80%)の溶血防止作用は顕著であることより、血液の体外循環用添加剤として(株)ミドリ十字からエキソコポール[®]として市販されている。各種動物における毒性試験結果から、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は毒性及び刺激性が極めて低いことが明らかであり、
5 抗原性等の副作用を示すとの報告もない(フレグランスジャーナル7, 82-87, 1974)。毒性試験の結果を表1に示す。

表 1

アデカ[®] プルロニックの急性毒性試験結果

10	アデカ [®] プルロニック	動 物 種	LD ₅₀ (g/kg)
	L-44, L-62, L-64	ラット	5
	F-68	マウス	>15
	F-68	ラット、ウサギ、イヌ	急性毒性反応なし
	P-85	ラット	34.6

15 一方、取り扱い上において、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は可逆的なゾル-ゲル相変化を示す点においてコラーゲンの温度変化における非可逆的相転移よりも優れる。この性質は、相変化を示す温度を至適なポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の選択及びそのポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリ
20 コール類の水溶液の濃度を変えることにより制御可能である(Int. J. Pharm. 22, 207-218, 1984, EP 0551626A1号)。

以上のことから、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は医薬用担体としての資質に優れており、局所麻酔剤・抗癌剤等の低分子量の薬物と組み合わせたり(Int. J. Pharm. 8, 89-99, 1981 及び Chem. Pharm. Bull. 32, 4205-4208, 1984)、インターロイキン等の
25 高分子量の生理活性タンパク質を混合する試みが既になされている(Pharm. Res. 9, 425-434, 1992)。

本発明は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子とを含む軟骨・骨誘導性修復用材料に関し、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成成分のポリプロピレングリコールの分子量が約1500～4000の範囲にあり、エチレンオキシド含量が約40～80％／分子の範囲にある軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。この構成成分の範囲内であれば、本発明のプルロニックの特性である温度によるゾルーゲル可逆変化を成し得るプルロニックになる。

さらに、本発明は、水溶液の形態であって、上記記載のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の対水溶液濃度が約10～50％からなる軟骨・骨誘導性修復用材料に関する。ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類は、一般的に水溶液の調製濃度等によりその可逆変化温度が変動することも知られており、上記構成成分の範囲にあるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類では体温付近すなわち37℃近辺では対水溶液濃度約10～90％の範囲でゲル化が起こる。最適な例としてはポリプロピレングリコールの分子量3850、エチレンオキシド含量が70％であるポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類（プルロニック F-127）を対水溶液濃度15～30％で調製する。

骨誘導因子(Bone morphogenetic protein: BMP)とは、未分化間葉系細胞を軟骨細胞へ誘導し、骨組織を形成する活性をもつ蛋白質である。

本発明で用いられる骨誘導因子の例としては、TGF- β ジーンスーパーファミリーに属するBMP-2からBMP-9等の一連のタンパク質、MP 52と称されるタンパク質、GDF-5と称されるタンパク質などがあげられるが、これらに限定されるものではない。BMP-2としては、Wangらが報告した遺伝子組み替え技術により Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて生産したタンパク質BMP-2 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2220-2224, 1990およびUS4877864号) およびMP 52としては本発

明者らが提案した遺伝子組み換え技術により製造される新規なタンパク質MP52（特願平7-93644号）が特に好適である。この新規なタンパク質は、MP52由来の配列表配列番号1記載のアミノ酸配列をコードするDNA配列のN末端にメチオニンをコードするコドンが付加したDNA
5 を含有するプラスミドを構築し、そのプラスミドを大腸菌に形質転換し、その大腸菌を培養することによって得られるインクルージョンボディを可溶化し、精製することによって得られる単量体のタンパク質を二量体に再生し、これを精製することによって得られる。

BMP-2およびMP52を有効成分とする15~30%ポリオキシエチレン
10 ポリオキシプロピレングリコール類の水性溶液をマウス大腿部筋肉内に注射し、投与後投与部位にMP52を保持させ、そこで異所性軟骨・骨形成能があることを観察した。

このように、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子との組み合わせからなる軟骨・骨誘導性修復用注入材料は
15 今まで報告されておらず、軟骨・骨修復、特に骨折治療剤として有効である。

本発明はさらに、骨誘導因子とポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を含む軟骨・骨修復剤に関する。

さらに本発明は、骨誘導因子とポリオキシエチレンポリオキシプロピ
20 レングリコール類を含む軟骨・骨修復剤をヒトまたは動物の骨折または骨欠損部位に適用することからなる軟骨・骨修復治療方法に関する。

図面の簡単な説明

図1は、アデカ®プルロニックの分類図である。横軸はポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の総分子中のエチレンオキサ
25 イドの含量を重量％で表し、縦軸はポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類の構成成分のポリプロピレングリコールの分子量を表す。

図2は、実施例4で得られたマウスの右後足大腿部の骨・軟骨石灰化組織の軟X線写真である。(a)はアデカ® プルロニックF-127のみ、(b)はMP52含有アデカ® プルロニックF-127をそれぞれ投与後2週間に撮影した。筋肉内に黒く見える部分が異所性に形成された骨マトリックスである。

図3は、実施例4で得られたマウスの右後足大腿部の非脱灰切片の組織染色顕微鏡写真である。フォンコッサ(von-Kossa)染色(a)において骨基質の形成が、ヘマトキシリン-エオシン(Hematoxylin-Eosin)染色(b)において骨芽細胞をともなった骨基質の形成および骨髓の形成が確認される。

図4は、参考例1(2)で得られたタンパク質MP52の発現ベクター(pK0T245)のプラスミドマップである。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例および参考例を示して本発明の効果を具体的に説明する。なお、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例1 BMP-2を含有する軟骨・骨誘導性修復用材料の調製法

アデカ® プルロニックF-127(旭電化工業)は、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類種の中で最も毒性が少ないものの一つとして知られている(製薬工場 6, 875-880, 1986)。このアデカ® プルロニックF-127 3.0gを注射用蒸留水7.0gに氷冷下溶解し、30%アデカ® プルロニックF-127水溶液を調製した。氷冷下アデカ® プルロニックF-127水溶液を96-ウエルタイタープレートに360 μ l/ウエルで分注し、80 μ g BMP-2を含む0.01N HCl 40 μ lを各ウエルに加え混和後、4℃で0.22 μ mのフィルターを透過させて滅菌し、全量約400 μ lのBMP-2注射剤とした(アデカ® プルロニックF-127の最終濃度は27%)。同様にアデカ® プルロニックF-127の最終濃度が10、15、18及び22.5%のBMP-2注射剤も作製した。

その結果、アデカ® プルロニック F-127 最終濃度 27% では 5℃ 以下、アデカ® プルロニック F-127 最終濃度 22.5% では 10℃ 以下、アデカ® プルロニック F-127 最終濃度 10% から 18% では 25℃ 以下で注入可能であり、37℃ においてゲル状に相変化したアデカ® プルロニック F-127 注射剤は、最終濃度が 15% 以上の製剤であった。従って、室温で液状であり 37℃ でゲル状を示したアデカ® プルロニック F-127 最終濃度 18% の製剤が最適である。

実施例 2 MP 52 を含有する軟骨・骨誘導性修復用材料の調製法

実施例 1 の BMP-2 を用いた軟骨・骨誘導性修復用材料の調製方法と同様にアデカ® プルロニック F-127 の最終濃度が 10、15、18、22.5 および 27% の MP 52 注射剤を作製した結果、MP 52 を用いても BMP-2 の場合と同様な注射剤つまりアデカ® プルロニック F-127 最終濃度 27% では 5℃ 以下、アデカ® プルロニック F-127 最終濃度 22.5% では 10℃ 以下、アデカ® プルロニック F-127 最終濃度 10% から 18% では 25℃ 以下で注入可能な製剤が得られた。

実施例 3 イン・ビボ (in vivo) における軟骨・骨誘導性修復用材料投与後の MP 52 の残存性

麻酔下雄性マウス (ICR 系、8 週令) の右後足大腿部の筋肉内に、実施例 2 の処方に ^{125}I 標識 MP 52 を添加して同様に作製した 18、22.5 及び 27% アデカ® プルロニック F-127 最終濃度の ^{125}I 標識 MP 52 注射剤を 23G 針で $100\mu\text{l}$ 投与し (約 $37\text{KBq } ^{125}\text{I} - \text{MP52} / \text{部位}$)、右後足からの放射能消失経過を 0.5、2 及び 8 時間後のその残存率を観察した。対照として、 $^{125}\text{I} - \text{MP 52}$ 水溶液の注射剤を用いた。結果を表 2 に示す。

表 2

アデカ® プルロニック F-127 製剤（最終濃度 18%
アデカ® プルロニック F-127）または水溶液剤を投
与後の右後足における¹²⁵I-MP 52 の残存率

5	時 間 (hr)	プルロニック製剤	水 溶 液 剤
	0.5	60.5%	32.7%
	2	19.7%	13.8%
	8	14.9%	7.9%

表 2 から、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を
10 医薬用担体として用いた場合、残存する MP 52 は単に MP 52 水溶液を注
入した場合に比較して明らかに薬物を保持することが示された。また実
施例 1 の注射剤についても同様の結果が得られた。

実施例 4 異所性軟骨・骨形成能による薬効試験

15 麻酔下雄性マウス（ICR 系、8 週令）の右後足大腿部の筋肉内に、実
施例 2 で作製した 18% アデカ® プルロニック F-127 最終濃度の MP 52
注射剤を 23 G 針で 100 μ l 投与した（20 μ g MP 52 / 部位）。この時対照と
しては、MP 52 を含有しないアデカ® プルロニック F-127 の注射剤を
用いた。軟骨・骨形成の判断は、投与 2 週間後に行った。マウスを頸椎
脱臼により屠殺後、投与部位である右後足を切り出し軟 X 線照射器によ
20 り撮像を得、投与部位における骨形成の有無を確認した。結果を図 2 に
示す（n = 5）。軟 X 線撮像の結果、アデカ® プルロニック F-127 のみ
（図 2 - a）では投与部位である筋肉内に影は認められなかったが、MP
52 を含有するアデカ® プルロニック F-127（図 2 - b）では試験した
動物の 80% 以上に明らかな影が確認された。

25 さらに、軟 X 線撮影終了後、検体を 10% ホルマリン内で保存し、組織
学的検査を実施した。図 2 - b に示した 5 匹のマウスのうち右端のマウ
スの組織染色の顕微鏡写真を図 3 に示す。図 3 においてフォンコッサ

(von-Kossa) 染色 (図 3 - a) により影の部分にカルシウムの沈着が観察され、ヘマトキシリン-エオシン (Hematoxylin-Eosin) 染色 (図 3 - b) の結果から骨芽細胞、骨基質および骨髄が認められ骨の形成が確認された。また炎症反応は観察されなかった。図中の BM、OB および MA はそれぞれ骨基質、骨芽細胞および骨髄を示す。

実施例 1 で作製した 18% アデカ® プルロニック F-127 最終濃度の BMP-2 注射剤についての同様の試験を実施したところ、同様の結果が得られた。

以上の結果からポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を骨形成因子の担体として使用する場合の安全性、有用性が確認された。

参考例 新規なタンパク質 MP 52 の調製

1. ベクターの作製

(1) 変異型 MP 52 成熟型部分の単離
ヒト MP 52 cDNA は、WO 93/16099 に記載された cDNA を含んだプラスミドベクター (pSK52s) を鋳型 DNA として、成熟型部分のみをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて増幅した。

開始コドン ATG 周辺の AT 含量を上げる事により、目的タンパク質の生産性を上げる方法 {M. Nobuhara らの報告 (Agric. Biol. Chem., 52 (6), 1331~1338, 1988)} に従い成熟型の MP 52 遺伝子の一部の DNA を置換した。

置換の方法は、配列番号 2 の順方向 PCR プライマーを用い、PCR 法で行った。PCR プライマーの DNA 配列は、順方向プライマーとして配列番号 2、及び逆方向プライマーとして配列番号 3 記載の DNA を用いた。

PCR は、同じ試験管中で、鋳型 DNA (10 ナノグラム)、順方向及び逆方向 PCR プライマー 各々 50 ピコモル、dNTP (0.2 ミリモル)、

及びMgCl₂ (1.5ミリモル) をTaq DNAポリメラーゼ (5 U) と共に加えることにより行った。

各サイクルが、変性 (94℃、1 分間)、プライマーアニーリング (55℃、1 分間)、およびプライマー伸長 (72℃、2 分間) からなる30サイクルのPCRを行った (以下のPCRはすべてこの条件で行った)。

PCR反応からの生成物を1.5%低融点アガロース (FMC社) 中で電気泳動により分離し、配列番号1のアミノ酸配列に相当する約360bpからなるDNAを切り出した (これをフラグメント1とする)。

(2) 本タンパク質の大腸菌発現ベクターの構築

プラスミドの複製数を上げるためには、複製オリジンをpBR系からpUC系に改変した。市販の大腸菌発現ベクターpKK223-3 (ファルマシア・バイオテック株式会社より購入) のtacプロモーター領域を制限酵素Ssp I とEcoR I で消化後、Mung Bean Nuclease (宝酒造株式会社、カタログ番号2420A) で処理し、フラグメント1の開始コドン側にT4DNA Ligase (宝酒造株式会社、カタログ番号2011A) で結合させ、pKK223-3のrrnBT₁T₂ターミネーター領域を制限酵素Sal I とSsp I で消化し、Sal I で消化したフラグメント1の終止コドン側に結合させ、pUC18のSma I 部位に組み込むことにより、本タンパク質の生産のための発現ベクター (pKOT245) (図4) を構築した。このベクターは通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に1995年4月14日付で受託番号FERM P-14895号として寄託され、1996年4月10日付でブダペスト条約に基づく寄託へ移管された (FERM BP-5499)。pKOT245のDNAの長さは3.7kbである。作製した本タンパク質発現ベクターは、Pharmacia ALF DNA シークエンサーによりその塩基配列の決定を行った。

(3) 形質転換

形質転換は、Kushnerらの塩化ルビジウム法 (Genetic Engineering,

p. 17, Elsevier (1978)) に従った。即ち、pKOT245を宿主大腸菌 W3110M へ上記の手法に従い移入し、本タンパク質生産大腸菌とした。

2. 培養

(1) 培養

5 本タンパク質発現大腸菌を改変SOC培地 (Bacto tryptone 20 g/ℓ, Bacto yeast extract 5 g/ℓ, NaCl 0.5 g/ℓ, MgCl₂·6H₂O 2.03 g/ℓ, Glucose 3.6 g/ℓ) で前培養し、生産用培地 (Bacto tryptone 5 g/ℓ, Citric acid 4.3 g/ℓ, K₂HPO₄ 4.675 g/ℓ, KH₂PO₄ 1.275 g/ℓ, NaCl 0.865 g/ℓ, FeSO₄·7H₂O 100mg/ℓ, CuSO₄·5H₂O 1mg/ℓ, 10 MnSO₄·nH₂O 0.5mg/ℓ, CaCl₂·2H₂O 2mg/ℓ, Na₂B₄O₇·10H₂O 0.225mg/ℓ, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.1mg/ℓ, ZnSO₄·7H₂O 2.25mg/ℓ, CoCl₂·6H₂O 6mg/ℓ, MgSO₄·7H₂O 2.2 g/ℓ, Thiamine HCl 5.0mg/ℓ, Glucose 3 g/ℓ) 5 ℓ に対し菌体懸濁液を100ml添加し、10 ℓ の培養槽で通気攪拌しながら培養し、対数増殖前期 (OD₅₅₀=5.0) に達した段階で1mM 15 の濃度でイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらにOD₅₅₀が150に達するまで培養した。培養中、温度は32℃、pHはアンモニアを添加することにより7.15に制御し、溶存酸素濃度の低下を防ぐために攪拌速度をあげることににより空気飽和の50%に溶存酸素濃度を制御した。また、高菌体濃度とするために溶存酸素濃度の急激な上昇 20 を指標として、50%グルコース溶液を0.2%濃度で添加しながら培養した。

(2) 大腸菌インクルージョンボディの調製

上記方法により得られた培養液を遠心して菌体を回収し、10mMエチレンジアミン四酢酸を含む25mM Tris-HCl緩衝液を (pH7.3) に懸濁し菌 25 体破碎装置 (ゴーリン社製) を用いて細菌を破碎し、再度遠心してインクルージョンボディを含む沈殿を回収した。

3. 精製

(1) 大腸菌インクルージョンボディの可溶化

大腸菌インクルージョンボディを1% Triton X-100で3回洗浄後、
3000×gで30分間、4℃で遠心し、得られた沈殿を20mM Tris-HCl緩衝
液、pH8.3、8 M尿素、10mM DTT、1 mM EDTAで超音波をかけながら可溶
5 化した。

(2) 単量体精製

その可溶化液を20000×gで30分間、4℃で遠心し、その上清を回収
した。得られた上清を20mM Tris・HCl緩衝液pH8.3、6 M尿素、1 mM
EDTAで平衡化したSP-Sepharose FF（ファルマシア社）に通し、同溶
10 液で洗浄後、0.5M食塩を含む同溶液で溶出させた。溶出液に Na_2SO_3 と
 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ をそれぞれ最終濃度が111mM、13mMになるように加え4℃、15
時間スルホン化を行った。スルホン化溶液を20mM Tris-HCl緩衝液、pH
8.3、6 M尿素、0.2M食塩、1 mM EDTAで平衡化したSephacryl S-200
HR（ファルマシア社）でゲル濾過を行い、単一なスルホン化された本タ
15 ンパク質単量体を得た。

(3) リフォールディング

スルホン化された本タンパク質単量体の溶液に9倍量の50mM Na-
Glycine緩衝液pH9.8、0.2M塩化ナトリウム、16mM CHAPS、5 mM EDTA、
2 mM GSH（還元型グルタチオン）、1 mM GSSG（酸化型グルタチオン）
20 を加えた後、1日間、4℃で攪拌しリフォールディングを行った。

(4) 二量体精製

リフォールディングされた試料を純水で2倍希釈し、6 N塩酸を加え
pHを約7.4に合わせて等電点沈殿を行った。沈殿を3000×g 20分の遠心
で集めた後、30%アセトニトリル、0.1%TFAに溶解した。その溶液を
25 純水で2倍希釈し、0.05%TFA、25%アセトニトリルで平衡化しておい
た逆相HPLCのRESOURCE RPCカラム（ファルマシア社）に通し、0.05%
TFA、25～45%アセトニトリルグラジェントにより溶出した。溶出液は

吸光度光度計を用い280nmの吸光度によりモニターし、精製された本発明のタンパク質二量体画分を得た。これを、スピードバックコンセントレーター（サーバント社）により凍結乾燥した。

(5) 精製された本タンパク質の物理化学的性質の測定

5 (ア) N末端アミノ酸配列分析

上記で得られた精製された本タンパク質につき、N末端アミノ酸配列をアミノ酸シークエンサー、モデル476A（アプライドバイオシステムズ社）により分析したところ、配列表配列番号1で示すN末端から30番目までのアミノ酸配列が確認された。

10 (イ) アミノ酸組成分析

上記で得られた精製された本タンパク質のアミノ酸組成をアミノ酸分析機〔PICO TAGシステム（ウォーターズ社）〕により調べた。その結果を表3に示す。表に示された数は1モノマー当りのアミノ酸残基数を示す。

15

表 3

20

25

アミノ酸	実 測 値	期 待 値
Asx	11.5	12
Glx	10.9	11
Ser	8.4	9
Gly	4.3	4
His	4.0	4
Arg	7.7	7
Thr	5.4	6
Ala	7.3	7
Pro	10.2	10
Tyr	2.9	3
Val	5.7	7
Met	5.1	4
$1/2$ Cys	2.6	7
Ile	4.9	6
Leu	10.0	10
Phe	4.0	4
Lys	5.9	6
Trp	—	2
配列の長さ		119

—：検出不可能

(ウ) 電気泳動による分析

上記で得られた精製された本タンパク質の分子量を非還元条件下の SDS-PAGEにより確認したところ、約28KDaの分子量を示した。

上記(ア)、(イ)および(ウ)に示された結果より、本タンパク質はN末端が単一にProから始まる119残基からなるタンパク質であることが解った。

産業上の利用可能性

本発明の軟骨・骨誘導性修復用材料は、外科的手術を必要としない骨折治療法において、生体吸収性が高く、有効成分である骨誘導因子との親和性が良く、温度によってゾルーゲル可逆変化を起こすことから操作が簡便なうえ、患者に外科的手術による苦痛を与えることなく患部に適用できる。本発明により骨誘導因子の薬効を持続させ、さらには副作用の少ない軟骨・骨誘導性修復用材料が提供できる。

15

20

25

配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：119

配列の型：アミノ酸

5 トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

起源：

生物名：ヒト (homo sapiens)

10 組織の種類：ヒト胎児

配列の特徴：

存在位置：

他の情報：MP52アミノ酸配列の383番目から501番目のアミノ酸配列。

配列：

15	CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT	48
	Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala	
	5 10 15	
	CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG	96
	Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp	
20	20 25 30	
	GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG	144
	Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu	
	35 40 45	
	GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT	192
25	Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His	
	50 55 60	
	GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA	240

Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro
 65 70 75 80
 CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG CGA CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC 288
 Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe
 5 85 90 95
 ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC 336
 Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val
 100 105 110
 GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG 357
 10 Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
 115 119

配列番号 : 2

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

15 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : 他の核酸

起源 : なし

生物名 : なし

20 株名 : なし

配列の特徴 : MP52成熟型単離用順方向PCRプライマー。

配列 :

ATAATGCCAC TAGCAACTCG TCAGGGC 27

配列番号 : 3

25 配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

起源：なし

生物名：なし

5 株名：なし

配列の特徴：MP52成熟型単離用逆方向PCRプライマー。

配列：

CGTCGACTAC CTGCAGCCAC ACGACT 26

10

15

20

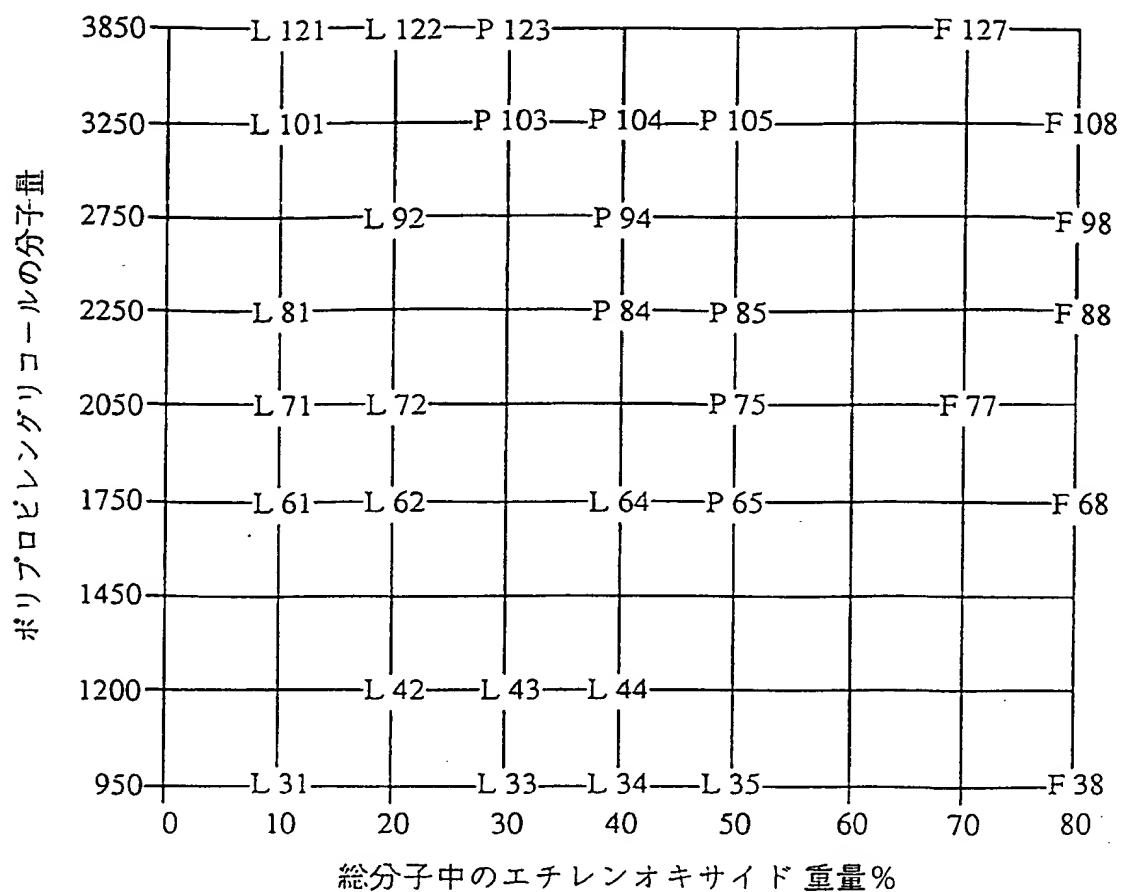
25

請 求 の 範 囲

1. ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因子とを含む軟骨・骨誘導性修復用材料。
2. 請求項 1 に記載のポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリ
5 コール類の構成成分であるポリプロピレングリコールの分子量が約1500
 ～4000の範囲にあり、エチレンオキサイド含量が約40～80%／分子の
 範囲にある軟骨・骨誘導性修復用材料。
3. 水溶液の形態であって、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン
 グリコール類の対水溶液濃度が約10～50%からなる請求項 2 に記載の
10 軟骨・骨誘導性修復用材料。
4. 骨誘導因子がタンパク質BMP-2である請求項 1～3 のいずれかの
 項に記載の軟骨・骨誘導性修復用材料。
5. 骨誘導因子がタンパク質MP52である請求項 1～3 のいずれかの項
 に記載の軟骨・骨誘導性修復用材料。
- 15 6. ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因
 子とを含む骨折・骨欠損治療剤。
7. ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類と骨誘導因
 子とを含む骨折・骨誘導性修復用材料をヒトまたは動物の骨折または
 骨欠損部位に適用することからなる、骨折または骨欠損の治療方法。

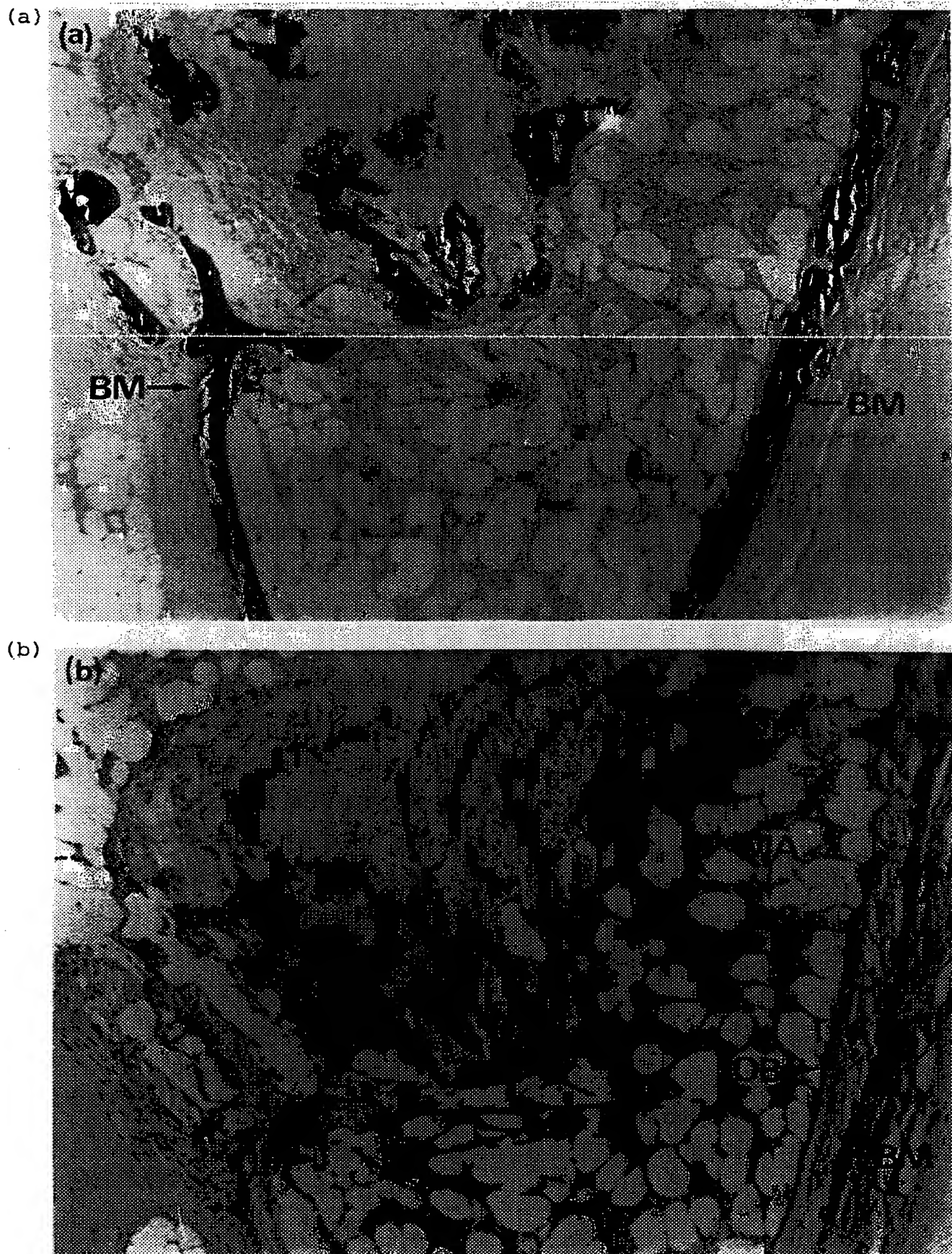
20

25



第 1 図





第 3 図



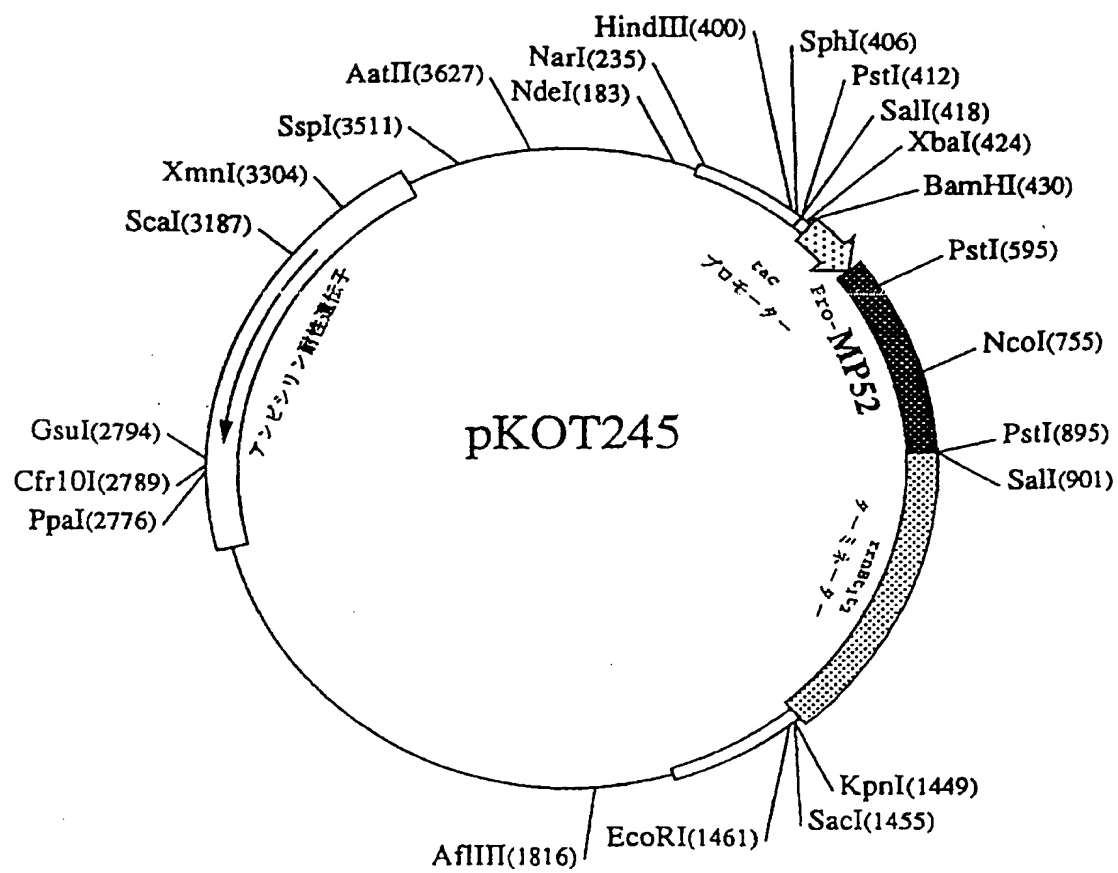
(a)



(b)



第 2 図



第 4 図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03333

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K38/18, A61K47/32, A61F2/28, A61B17/56, A61M37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K38/18, A61K47/32, A61F2/28, A61B17/56, A61M37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI/L on DERWENT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P	WO, 96/21427, A (Atrix Laboratories, Inc.), July 18, 1996 (18. 07. 96) & AU, 9646525, A	1, 6
Y	WO, 94/1483, A (Collagen Corp.), January 20, 1994 (20. 01. 94), Page 10, lines 13 to 14; page 15, line 4 & JP, 8-502082, A & US, 5292802, A & EP, 648239, A	1-4, 6
Y	JP, 61-277612, A (Kiyoshi Morikawa), December 8, 1986 (08. 12. 86) (Family: none)	1-4, 6
Y	JP, 6-508777, A (Genetics Institute, Inc.), October 6, 1994 (06. 10. 94) & WO, 93/50, A & EP, 591392, A	1-4, 6
Y	JP, 62-135431, A (Koken K.K.), June 18, 1987 (18. 06. 87) (Family: none)	1-4, 6
Y	JP, 1-265968, A (Collagen Corp.),	1-4, 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search
January 20, 1997 (20. 01. 97)

Date of mailing of the international search report
January 28, 1997 (28. 01. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03333

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	October 24, 1989 (24. 10. 89) & US, 4863732, A & EP, 321277, A & DE, 3869577, A	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. —

PCT/JP96/03333

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 7 pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ A 61K 38/18, A 61K 47/32, A 61F 2/28, A 61B 17/56, A 61M 37/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁸ A 61K 38/18, A 61K 47/32, A 61F 2/28, A 61B 17/56, A 61M 37/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE, WPI/L on DERWENT		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P	WO, 96/21427, A (ATRIX LABORATORIES, INC.) 18. 7月. 1996 (18. 07. 96) & AU, 9646525, A	1, 6
Y	WO, 94/1483, A (COLLAGEN CORPORATION), 第10 頁, 第13~14行, 第15頁, 第4行 20. 1月. 1994 (20. 01. 94) & JP, 8-502082, A & US, 5292802, A & EP, 648239, A	1-4, 6
Y	JP, 61-277612, A (森川 清志) 8. 12月. 1986 (08. 12. 86), ファミリー無し	1-4, 6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 20. 01. 97		国際調査報告の発送日 28.01.97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 6-508777, A (ジェネティックス・インスティテュート・インコーポ レイテッド) 6. 10月. 1994 (06. 10. 94) & WO, 93/50, A & EP, 591392, A	1-4, 6
Y	JP, 62-135431, A (株式会社高研) 18. 6月. 1987 (18. 06 . 87), ファミリー無し	1-4, 6
Y	JP, 1-265968, A (コラーゲン コーポレーション) 24. 10月. 19 89 (24. 10. 89) & US, 4863732, A & EP, 321277, A & DE, 3869577, A	1-4, 6

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲7は、治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、P C T第17条(2)(a)(i)及びP C T規則39.1(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)